

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. März 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/025567 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/53**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/03414

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. September 2002 (13.09.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 45 226.8 13. September 2001 (13.09.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BERNARD, André** [DE/DE]; Hafengasse 11, 72070
Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DÜBEL, Stefan**
[DE/DE]; Im Langgewann 6a, 69221 Dosenheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PRODUCTION OF SUPPORT-BONDED MOLECULES

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG VON TRÄGERGEBUNDENEN MOLEKÜLEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a support for binding assays, whereby the assignment and coupling of trap molecules occurs on the solid phase by simple coating of a surface (support), pretreated in a determined manner, with a solution which contains a mixture of specially derivatised targets (trap molecules). The assignment of a particular molecule to a particular location on the support is guaranteed by a system of tagging molecules ("tags"), recognized by receptor molecules arranged in a determined manner on said support. These tags and their receptor molecules are typically nucleic acid fragments, but can also correspond to other molecule categories, in particular leucine zippers, antigen-antibody pairs or other protein pairs. The present invention also relates to a method for the production of such supports and trap molecules, as well as the application thereof after coupling.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung beschreibt Träger für Bindungsassays, bei dem die Zuordnung und Kopplung von Fänger-molekülen an die Festphase durch einfaches Übersichten einer in bestimmter Weise vorbehandelten Fläche (Träger) mit einer Lösung geschieht, welche ein Gemisch speziell derivatisierter "Targets" (Fängermoleküle) enthält. Die Zuordnung eines bestimmten Moleküls zu einem bestimmten Platz auf dem Träger wird durch ein System von Markierungsmolekülen ("Tags") gewährleistet, welche von in bestimmter Form angeordneten Rezeptormolekülen auf dem Träger erkannt wird. Diese "Tags" und ihre Rezeptormoleküle sind typischerweise Nukleinsäurestücke, können aber auch andere Molekülklassen sein, insbesondere Leucin-zipper, Antikörper-Antigen-Paare oder andere Proteinpaa-re. Die Erfindung beschreibt weiterhin Verfahren zur Herstellung solcher Träger und der Fängermoleküle, sowie deren Anwendung nach der Kopplung.



WO 03/025567 A2

„Herstellung von trägergebundenen Molekülen“

Zweck der Erfindung:

- 5 Proteomics und Genomics erfordern immer komplexere Bioarrays zur hochparallelen Analyse komplexer Gemische von Biomolekülen. Die Herstellung solcher Bioarrays, im besonderen von Protein-Arrays wie z.B. Antikörperarrays, erfolgt nach Stand der Technik entweder aufwendig durch einzelnes (serielles) Aufbringen der „Target“-Moleküle z.B. mithilfe von Spottern oder Druckern, oder durch kombinatorische
- 10 Synthese aus Monomeren in einem seriellen Prozess für jeden Syntheseschritt. Eine wesentliche Erleichterung der Produktion solcher Bioarrays und damit eine preiswertere Herstellung würde durch einen nicht-seriellen Aufbringungsschritt der Proteine ermöglicht. Damit bei einem solchen Verfahren eine genaue Positionszuordnung des einzelnen Proteins zu einer bestimmten Stelle des Arrays
- 15 möglich ist, mußten bisher extrem aufwendige und nicht mit hoher Komplexität herstellbare Mikrokanal-Festkörper eingesetzt werden, welche verschiedene Flüssigkeitszuführungen für verschiedene Positionen auf dem Array gewährleisten.

Diese Erfindung beschreibt ein Verfahren, bei dem die Zuordnung der „Target“-

- 20 Proteine durch einfaches Übersichten einer in bestimmter Weise vorbehandelter Fläche (Träger) mit einer Lösung geschieht, welche ein Gemisch speziell derivatisierter „Target“-Proteine enthält. Die Zuordnung eines bestimmten Proteins zu einem bestimmten Platz auf dem array wird durch ein System von

Markierungsmolekülen (im weiteren als „tags“ bezeichnet) gewährleistet, welche von in bestimmter Form angeordneter Rezeptormoleküle auf dem Träger erkannt werden (Figs. 1 und 2). „Tags“ und ihre Rezeptormoleküle sind typischerweise Nukleinsäurestücke, können aber auch andere Molekülklassen sein, insbesondere Leuci, zipper, Antikörper-Antigen-Paare oder andere Proteinpaare.

Die Erfindung ermöglicht insbesondere ein Verfahren zur preiswerten Herstellung einer großen Zahl verschiedener Bindemoleküle (insbesondere von Antikörpern, synthetischen Bindemolekülen wie Einzeldomänenantikörpern, Anticalinen, RNA-Aptameren und ihrer Derivate, Fibronectin-Domänen mit randomisierten Loopbereichen) mit daran gebundenem „tag“ in einem Gemisch, aus dem danach spezifische Bindemoleküle isoliert werden und bereits mit einem eindeutigen „tag“ versehen sind. Zur Herstellung eines Arrays mit bekannter Anordnung von Proteinen muß dann nur noch die Verknüpfung der Bindungsspezifität des Bindemoleküls mit seiner „tag“-Sequenz bekannt sein. Diese Verknüpfung ist insbesondere durch DNA-Sequenzierung von durch Bindung selektierten Klonen einfach erhältlich. Der gesamte Herstellungsvorgang einer komplexen Mischung von typischerweise 20-200000 verschiedenen Bindeproteinen erfordert dabei lediglich 2 Analyseschritte: die Überprüfung der Bindungsfähigkeit des Bindeproteins (1) und die Sequenzierung des „tags“

Der Schlüsselvorgang dabei ist die Kopplung von „tag“ und Bindeprotein während der Synthese des Bindeproteins. Eine eindeutige Zuordnung bei einer solchen

Kopplung wird dadurch gewährleistet, daß die Nukleinsäure, welche für das Bindeprotein codiert, an das fertige Bindeprotein gebunden wird, nachdem dieses fertig synthetisiert wurde. Ein solcher Vorgang ist z.B. in Form des Ribosomal Display (Roberts und Szostak, PNAS USA Vol 94, pp. 12297-12302, 1997)

- 5 beschrieben – hier erzeugt ein Puromycin am 3'-Ende der RNA eine kovalente Bindung zu dem von dieser RNA translatierten Polypeptid. Um störende Wechselwirkungen des für das Bindeprotein codierenden, langen Nukleinsäurestranges bei der später vorgesehenen Hybridisierung der „tag“-Sequenz zu unterbinden, wird in einem weiteren Schritt eine Verkürzung der gekoppelten RNA durchgeführt, welche
- 10 lediglich die „tag“-Sequenz und kurze flankierende Regionen, gekoppelt an das Polypeptid, übrig läßt.

- Zur Herstellung des Proteinarrays nach Selektion og. Bindungsprotein-„tag“-Paare für die nachzuweisenden Liganden (8) wird eine komplexe Mischung von
- 15 Bindungsprotein-„tag“-Komplexen (mit unterschiedlicher Bindungsspezifität) über einen nach Stand der Technik hergestellten Oligonukleotidarray überschichtet, dessen Oberfläche an definierten Stellen mit zu den in der Mischung von Bindungsprotein-„tag“-Komplexen komplementären Nukleotidsequenzen beschichtet ist. Durch Hybridisierung von „tag“ und Gegenstrang wird eine ortsbekannte Kopplung der
- 20 Bindeproteine an den Array erreicht.

Dieser Array kann dann zum Nachweis von Liganden (8) in einer Probe eingesetzt werden, insbesondere durch die Verwendung direkt (oder in mehreren Schritten

indirekt) Fluoreszenz- oder Enzym-markierten Liganden, Plasmonresonanz oder anderen Detektionsverfahren nach Stand der Technik.

Der erfindungsgemäße Produktionsprozess eines Mikroarrays von Proteinen bietet

5 signifikante Einsparungen gegenüber bestehenden Methoden, da er

- lediglich zwei Analyseschritte (Bindungsassay und Sequenzierung einer kurzen Nukleinsäuresequenz) zur Definition des Bindungsprotein-, „tag“-Paares erfordert,
- in einem Schritt durch einfaches Inkubieren in einem Gemisch von Bindungsprotein-, „tag“-Paaren hergestellt wird.

10 - Zudem kann in einer Ausführungsvariante komplett in vitro durchgeführt werden (Selektion aus kombinatorischen Genbibliotheken)

Damit wird der bisher sehr aufwendige Weg zu hochkomplexen Protein-Arrays durch Vermeidung des bisher notwendigen sequenziellen Aufbringens der verschiedenen

15 Bindungsproteine („spotten“) deutlich vereinfacht.

Beispiel 1: Herstellung eines Proteomic-Microarrays

Mithilfe kombinatorischer Methoden nach Stand der Technik werden hochkomplexe

20 (über 10^{10} verschiedene Sequenzen) Ribosomal-Display-Genbibliotheken von

Fibronectin-Domänen-Analogen mit randomisierten Loop-Bereichen hergestellt.

Solche Genbibliotheken werden z.B. von der Fa. Phyllos, Lexington, Massachusetts, USA, hergestellt. In einem zweiten Klonierungsschritt werden einige Nukleotide in

- Leserichtung hinter dem Translations-Stopcodon des offenen Leserasters, welcher für die Fibronectin-Domänen-Analogen mit randomisierten Loop-Bereichen codiert, eine zweite randomisierte Region einkloniert. Diese wird durch Polymerase-Kettenreaktion mit einem in der mittleren Region randomisiert synthetisierten
- 5 Oligonukleotid als Template und 2 Primern, welche an die beiden nichtrandomisierten Enden des Templates hybridisieren, hergestellt und mittels Restriktionsverdau einkloniert (eine andere Möglichkeit für die Herstellung mehrfach randomisierter Sequenzen ist in Hayashi et al., (1994, BioTechniques Vol.17, pp310-313) beschrieben). Die Länge der randomisierten Nukleotidsequenz ist dabei so gewählt,
- 10 daß die entstehende theoretische Komplexität (Anzahl aller möglicher verschiedener Kombinationen dieser Nukleotide) größer ist als die der Genbibliothek von Bindeproteinen, die weiter vorne auf der Nukleinsäure codiert ist. Zwischen den beiden Genbibliotheken liegt eine Linker-Sequenz, welche später zum Abschneiden unnötiger RNA dient. Mit dem entstehenden DNA-Konstrukt (Fig. 3) wird ein
- 15 Ribosomal-Display-Vorgang nach Stand der Technik (US Patent App. 6258558) durchgeführt und so viele verschiedene (typischerweise 20 – 500 000) Binder gegen die unterschiedlichen Proteine einer Zelle hergestellt.

- Im weiteren Verlauf wird die Bindungsaktivität der durch das Ribosomal Display
- 20 selektierter Klone durch einen Bindungsassay (z.B. ELISA, Immunoblot, Plasmon-Resonanz-Analyse) festgestellt und die Nukleotid-Sequenz der dazugehörigen Nukleinsäure im Bereich der „tag“-Sequenz bestimmt. Da die theoretische Komplexität der „tag“-Sequenzen größer, im Idealfall mehrere Größenordnungen

größer ist als die der Genbibliothek von Bindeproteinen, ist gewährleistet, daß mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit jedes Bindeprotein ein individuelles „tag“ besitzt. Die Sequenzinformation dieser Tags wird eingesetzt, Oligonukleotid-Arrays mit ihren komplementären Strängen zu generieren, z.B. nach den bekannten Verfahren der

5 Firmen Affymetrix, USA, oder Febit AG, Mannheim.

Aus den charakterisierten Klonen wird nun in einem zweiten, dem Ribosomal Display ähnlichen, diesmal aber präparativen Schritt das mit dem „tag“ versehene Bindemolekül hergestellt. Im Detail werden dazu mit Puromycin verbundene mRNA-Moleküle hergestellt und eine in-vitro-Translation durchgeführt. Die erforderliche zellfreie Translation kann zur Erleichterung der Reinigung nach Shimizu et al., Nature Biotech Vol 19, p. 751-755, 2001) durchgeführt werden. Sie kann auch in einem Gemisch aller Bindemoleküle geschehen, was den enormen Aufwand einzelner Präparationen für jeden Klon einspart. Da die „tag“-Sequenz hinter dem Translations-

10 Moleküle hergestellt und eine in-vitro-Translation durchgeführt. Die erforderliche zellfreie Translation kann zur Erleichterung der Reinigung nach Shimizu et al., Nature Biotech Vol 19, p. 751-755, 2001) durchgeführt werden. Sie kann auch in einem Gemisch aller Bindemoleküle geschehen, was den enormen Aufwand einzelner Präparationen für jeden Klon einspart. Da die „tag“-Sequenz hinter dem Translations-

15 Stoppsignal liegt, wird automatisch ein „tag“ an jedes Bindeprotein angehängt.

Um störende Wechselwirkungen des für das Bindeprotein codierenden, langen Nukleinsäurestranges bei der später vorgesehenen Hybridisierung der „tag“-Sequenz zu unterbinden, wird nach Reinigung der „tag“-Bindeprotein-Komplexe aus der

20 Translationsreaktionsmischung eine Verkürzung der gekoppelten RNA durchgeführt, welche lediglich die „tag“-Sequenz und kurze flankierende Regionen gekoppelt an das Polypeptid übrig läßt. Eine solche Verkürzung kann nach Stand der Technik auf verschiedene Weise erfolgen. Es kann ein kurzes (typischerweise 5-20nt langes)

Oligonukleotid, welches komplementär zur Linker-Region (10) ist, an diese hybridisiert werden, nachdem die Selektion anhand der Bindung der Bindeproteine durchgeführt wurde. Dadurch wird diese kurze Region schneidbar durch bestimmte Nukleasen, insbesondere RnaseH (Fig. 4). Eine andere Möglichkeit, eine solche Verkürzung durchzuführen, ist die Verwendung von nukleaseresistenten Formen der RNA statt der für den Selektionsprozess für die Bindemoleküle; in diesem Falle würde die Nukleinsäurederivate, welche analog zur mRNA eingesetzt werden, so synthetisch hergestellt, daß die Linker-Region (10) aus nicht nukleaseresistenten Nukleotiden oder DNA besteht, während der Rest der Sequenz aus nukleaseresistenten Nukleotiden besteht (z.B. PNA oder Nukleinsäurestränge aus SP-Diastereomeren von Ribonucleosid-5'-O-(1-Thiotriphosphaten)) (Fig. 5).

Nach Verkürzung der Nukleinsäure wird das Gemisch aus Bindeprotein-, „tag“-Komplexen einer säulenchromatographischen Reinigung auf einem Ionentauscher-Material unterzogen, um die abgespaltenen Sequenzen zu entfernen. Das so gereinigte Gemisch wird auf einen Array aufgetragen und bei 67°C für 24 Stunden inkubiert, sodaß sich die nichtkovalenten Bindungen zwischen „tag“ und seiner Rezeptorsequenz ausbilden können. Der Array wird 5 mal mit PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, pH 7.3) gewaschen, um nicht gebundene Bindemoleküle zu entfernen, und kann dann sofort für eine Bindereaktion zum Nachweis von Liganden in einer Probe eingesetzt werden. Einen Überblick über den ganzen erfindungsgemäßen Weg zur Herstellung einem Proteomics-Chips gibt Fig. 6.

Beispiel 2

Herstellung eines Antikörper-Arrays

- 5 Nach Stand der Technik wird ein Oligonukleotidarray hergestellt, auf welchem 10 000 für eine optimale Bindung und minimale Kreuzhybridisierung optimierte Oligonukleotide an bekannten Positionen aufgebracht wurden.

Eine Genbibliothek von ScFv-Antikörperfragmenten im Phagendisplay-vektor

- 10 pSEX81 wird auf den gewünschten Antigenen gescreent und die gewünschten Binder nach Stand der Technik kloniert (Welschhof, et al., (1997) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 94, 1902-1907). Durch Umklonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pSTE (Dübel et al., J. Immunol. Meth. 178, 201-209) werden Streptavidin-Fusionsproteine der selektierten Antikörperklone hergestellt. Der pSTE-Vektor wurde vor dem
- 15 Einsetzen der Gene für die ScFv-Antikörperfragmente durch Insertion einer kurzen Nukleinsäuresequenz hinter dem Stopcodon für das Streptavidin verändert, welche gewährleistet, daß später an dieser Stelle die translatierte RNA abgeschnitten werden kann (s. Beispiel 1)) Die für die Antikörper-Streptavidin-Fusionsproteine codierenden DNA-Stücke werden inklusive dieser Linker-Sequenz aus E. coli-
- 20 Plasmid-DNA-Präparation durch Restriktionsverdau gewonnen. Die ausgeschnittenen Genstücke, enthaltend die kodierende Sequenz für das Antikörper-Streptavidin-Fusionsprotein und die Linkersequenz, werden in einzelnen Ligation mit jeweils einer spezifischen Tag-Sequenz verbunden. Die dazu verwendeten doppelsträngigen

Oligonukleotide wurden durch Hybridisierung von zwei komplementären synthetischen Oligonukleotiden hergestellt, wobei das entstehende Dopplestrang-Nukleinsäurestück an dem nicht zu ligierenden Ende mit einer Biotin-Gruppe derivatisiert ist. Die Ligationsprodukte werden durch Ethanolfällung gereinigt und konzentriert und dienen als Template in einer Ribosomen-Display-Reaktion nach Hanes und Plückthun (1997, Proc Natl Acad Sci U S A 13;94(10):4937-42). Während der dazugehörigen in vitro Translation koppelt das biotinylierte Ende der Nukleinsäure an das Antikörper-Streptavidin-Fusionsprotein, welches von diesem Ribosom hergestellt wurde, und bewirkt die Ausbildung des Bindemolekül-,tag“-

5 Paares.

10 Die weitere Prozedur wird entsprechend Beispiel 1 durchgeführt.

Abbildungsbeschreibungen:

Fig. 1: Immobilisierung des Bindungsproteins (1) durch Hybridisierung des „tags“ (4) mit einem Rezeptormolekül (z.B. einem Nukleinsäuregegenstrang) (5), welcher über ein Bindungselement (6) auf dem Array verankert ist.

Fig.: 2 Der Immobilisierung auf dem Array nachfolgende kovalente Verknüpfung (7) (2 verschiedene Möglichkeiten der Bindung sind angezeigt) mit diesem und darauffolgender Nachweis einer Probe (8) durch Bindung an das immobilisierte Bindungsprotein (1); die Bindung der Probe (8) erzeugt dabei ein detektierbares Signal, z.B. Fluoreszenz, Änderung der Reflektionseigenschaften, der Leitfähigkeit, der Masse oder der Plasmonresonanzeigenschaften.

Fig. 3. mRNA-Strang mit genetischen und molekulare Elementen der Genbibliothek für das “Ribosomal Display”.

Dabei sind:

9 Genetische Bibliothek, codiert für Bindemoleküle

10 linker, der das Abschneiden ermöglicht

11 Genetische Bibliothek randomisierter Nukleotide (“tag“-Bibliothek)

20 12 Puromycin-Gruppe

13 nicht notwendigerweise sequenzidentische Spacersequenzen

Fig. 4: Abspaltung nach der Selektion nicht mehr benötigter Nukleinsäuresequenzen durch Hybridisierung eines Oligonukleotides und nachfolgendem Nukleaseverdau.

14 Gegenstrang-Oligonukleotid zur Linker-Region (10)

5 Fig. 5: Abspaltung nach der Selektion nicht mehr benötigter Nukleinsäuresequenzen durch Einbau eines nicht nukleaseresistenten Nukleinsäurestückes und nachfolgendem Nukleaseverdau.

15 nicht nukleaseresistenten Nukleinsäurestück in der Linker-Region (10)

16 nukleaseresistente „tag“-Region

10 17 für das Bindeprotein (1) codierende Nukleinsäureregion

Fig. 6 Herstellung eines Protein-Arrays nach Beispiel 1

15

Ansprüche:

1. Trägergebundene Molekülanordnungen für die chemische, biochemische oder biomedizinische Analytik, dadurch gekennzeichnet, daß

5

a) das an einen Träger (2) zu bindende Bindungsmolekül (1) über eine kovalente oder nichtkovalente Bindung (3) an ein „tag“ (4) gebunden ist. Dieses wird von einem Rezeptormolekül (5) erkannt, welches seinerseits über eine kovalente oder nichtkovalente Bindung (6) an einen Träger (2) gebunden ist.

10

b) ~~aus~~ diese Moleküle Arrays biologischer oder chemischer Substanzen bilden, dadurch gekennzeichnet, daß verschiedene Moleküle (1) an verschiedene „tags“ (4) gebunden sind, wobei jeweils eine bestimmte typische Zusammensetzung des „tags“ (4) für ein bestimmtes Molekül (1) gegeben ist und das „tag“ somit eine Identifikation (analog zu einem Namenschild oder einer Nummer) für das Molekül (1) darstellt. Der Array von verschiedenen Molekülen (1) an für jedes der verschiedenen Moleküle (1) definierten Positionen wird dann durch Mischen einer Molekülbibliothek bestehend aus Molekülkomplexen von Molekül (1) und „tag“ (4), verbunden durch (3) und einem vorgefertigten Array auf einem Träger (2), auf dem die Rezeptormoleküle (5) durch Bindung (6) in definierter Anordnung aufgebracht sind, sich durch Bindung von „tag“ (4) an Rezeptormolekül (5) ausbilden.

15

20

c) ~~die~~ die Molekülkomplexe von Molekül (1) und „tag“ (4), verbunden durch (3), während eines biochemischen Prozesses, insbesondere enzymatischer Reaktionen, Translation, Transkription, Polymerisation oder Replikation, hergestellt werden, sodaß eine Zuordnung eines bestimmten „Tags“ (4) zu einem bestimmten Molekül (1) erzeugt wird.

2. Trägergebundene Molekülanordnungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das „tag“ (4) eine Nukleinsäure, oder ihr Derivat, insbesondere DNA, RNA oder ihren nukleaseresistenten Derivaten wie PNA oder thioRNA, enthält und das Rezeptormolekül (5) einen dazu komplementären Gegenstrang einer Nukleinsäure, oder ihres Derivats, insbesondere DNA, RNA oder ihren nukleaseresistenten Derivaten wie PNA oder thioRNA, enthält.

3. Trägergebundene Molekülanordnungen nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Molekülkomplexe aus Molekül (1) und „tag“ (4), verbunden durch (3), durch eine zusätzliche Bindung (7), welche während oder nach der Ausbildung der Bindung zwischen „tag“ (4) und Rezeptormolekül (5) erfolgt, zusätzlich auf dem Träger stabilisiert werden.

4. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere zusammenhängenden Flächen mit Bindemolekülen beschichtet werden, wobei die einzelne mit Bindemolekülen beschichtete Fläche von nicht mit

Bindemolekülen beschichtete Flächen umgeben ist und eine einzelne mit Bindemolekülen beschichtete Fläche jeweils weniger als 100 Mikrometer x 100 Mikrometer bedeckt, insbesondere weniger als 10 x 10 Mikrometer.

5 5. Trägergebundene Molekülanordnungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß nachweisbare Probenmoleküle (8) mit der
10 trägergebundenen Molekülanordnung in einer Weise in Kontakt gebracht werden, die einen nachfolgenden Nachweis gebundener Probenmoleküle (8) mithilfe optischer Verfahren ermöglicht, insbesondere durch resonante oder nichtresonante optische Effekte wie Spiegelung, Brechung, Plasmon-Resonanz, Streuung, Beugung, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Lumineszenz, Änderung der Polymersisationsebene, Änderung der Absorption oder Transmission, Phasenverschiebung oder Quenching.

6. Trägergebundene Molekülanordnungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
15 dadurch gekennzeichnet, daß nachweisbare Probenmoleküle (8) mit der trägergebundenen Molekülanordnung in einer Weise in Kontakt gebracht werden, die einen nachfolgenden Nachweis gebundener Probenmoleküle (8) mithilfe elektromagnetischer Verfahren auslesbar ist, insbesondere durch magnetische Effekte, elektrostatische Effekte, Resonanzfrequenzänderung bei Massenänderung, Hall-Effekt
20 oder Leitfähigkeits- Widerstands- oder Kapazitätsänderungen.

7. Gerät zur Herstellung eines Trägers nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte, aber nicht notwendigerweise alle Schritte, welche

zur Bildung der Träger notwendig sind, unter definierten Umgebungsbedingungen durchgeführt werden sowie vorzugsweise halbautomatisch oder automatisch durchgeführt werden.

- 5 8. Gerät zur Analyse von molekularen Bindungsreaktionen an einem Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Bindung von Probenmolekülen (8) mithilfe optischer Verfahren durchgeführt wird, insbesondere resonanter oder nichtresonanter optischer Effekte wie Spiegelung, Brechung, Plasmon-Resonanz, Streuung, Beugung, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, 10 Lumineszenz, Änderung der Polimersisationsebene, Änderung der Absorption oder Transmission, Phasenverschiebung oder Quenching.

9. Gerät zur Analyse von molekularen Bindungsreaktionen an einem Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Bindung 15 von Probenmolekülen (8) mithilfe elektromagnetischer Verfahren durchgeführt wird, insbesondere durch magnetische Effekte, elektrostatische Effekte, Resonanzfrequenzänderung bei Massenänderung, Hall-Effekt oder Leitfähigkeits-Widerstands- oder Kapazitätsänderungen.

- 20 10. Gerät zur Analyse von molekularen Bindungsreaktionen an einem Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, insbesondere zur Anwendung in biochemischen Labors, in Labors von Arztpraxen und Krankenhäusern sowie in allen Bereichen des Umweltschutzes, der Qualitätskontrolle, der Biotechnologie, Forensik, Agrar- und

Pflanzenhybridanalytik, sowie der molekularbiologischen, pharmazeutischen und medizinischen Forschung und Entwicklung.

11. Kit, enthaltend die wesentlichen Substanzen zur Durchführung einer oder
5 mehrerer Analysen mit den in den Ansprüchen 1 bis 10 beschriebenen Trägern und
Geräten.

12. Verfahren zu Herstellung trägergebundener Molekülanordnungen für die
chemische, biochemische oder biomedizinische Analytik nach Fig. 6.

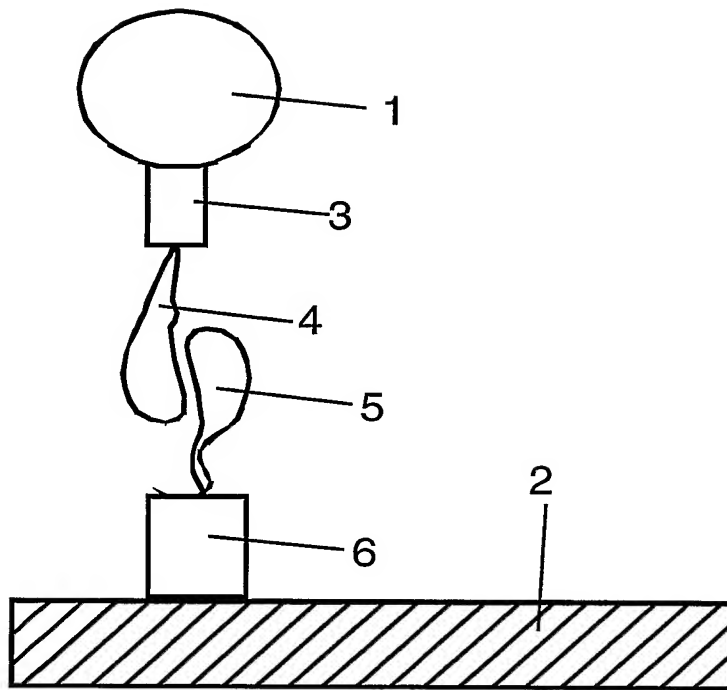


Fig. 1

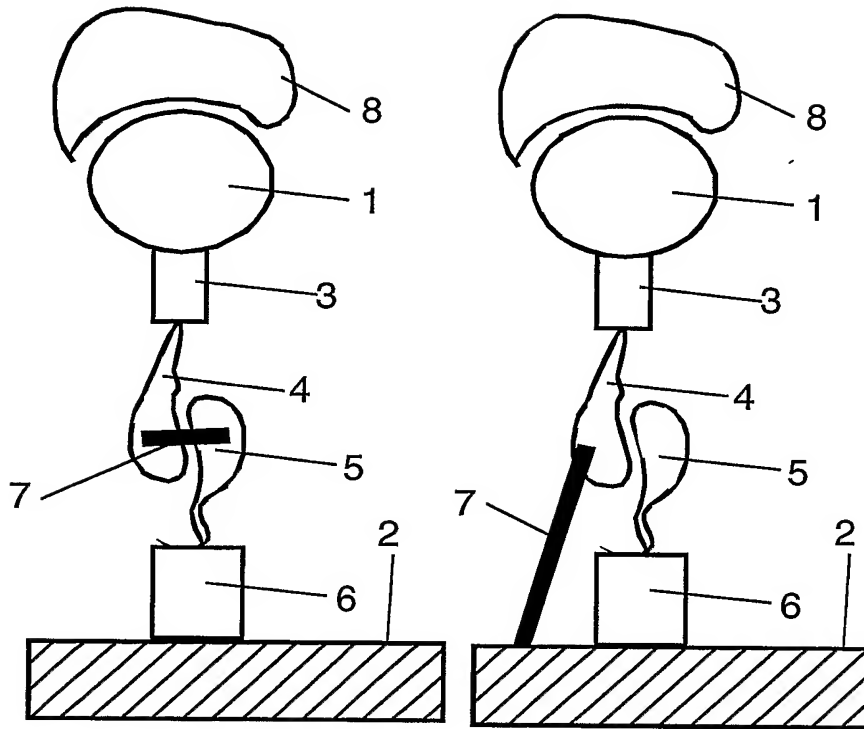


Fig. 2

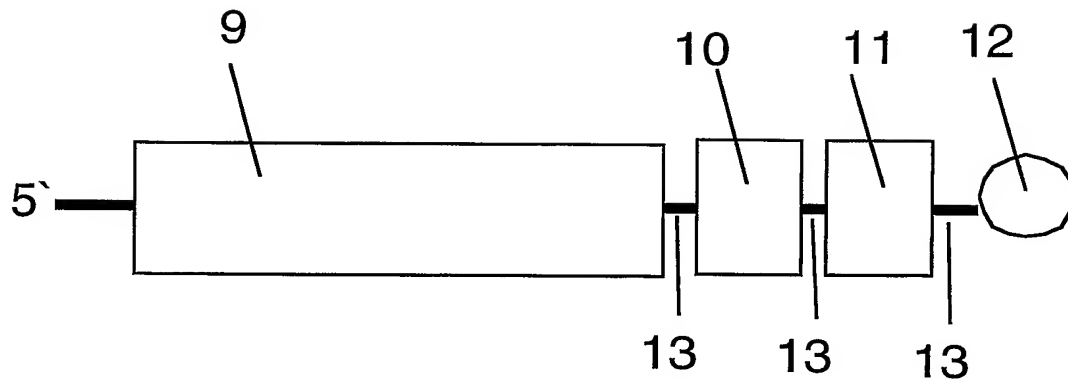


Fig. 3

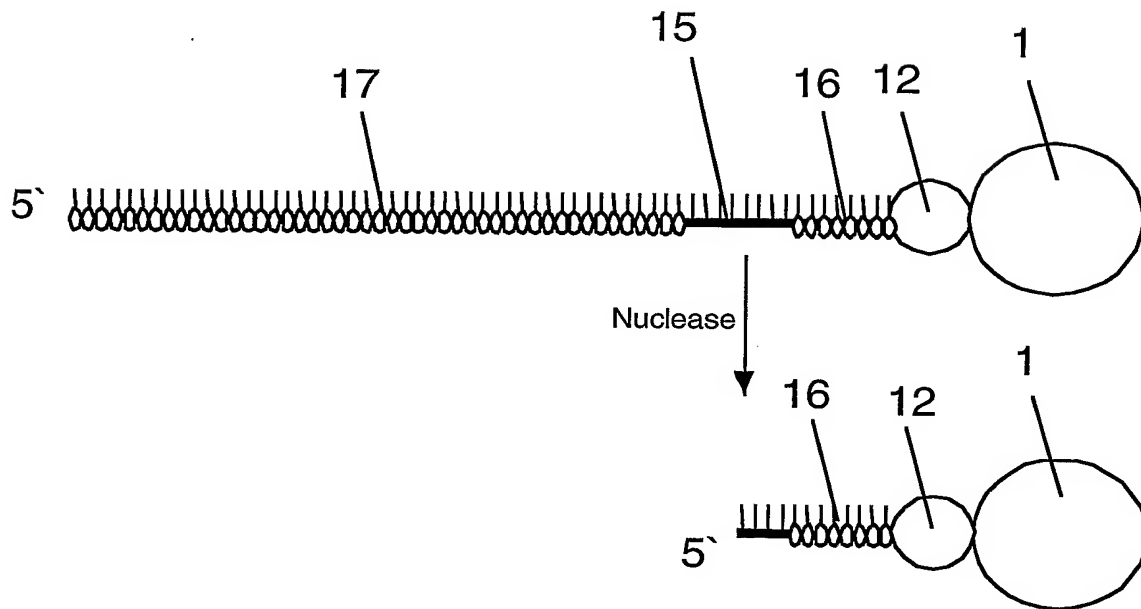


Fig. 4:

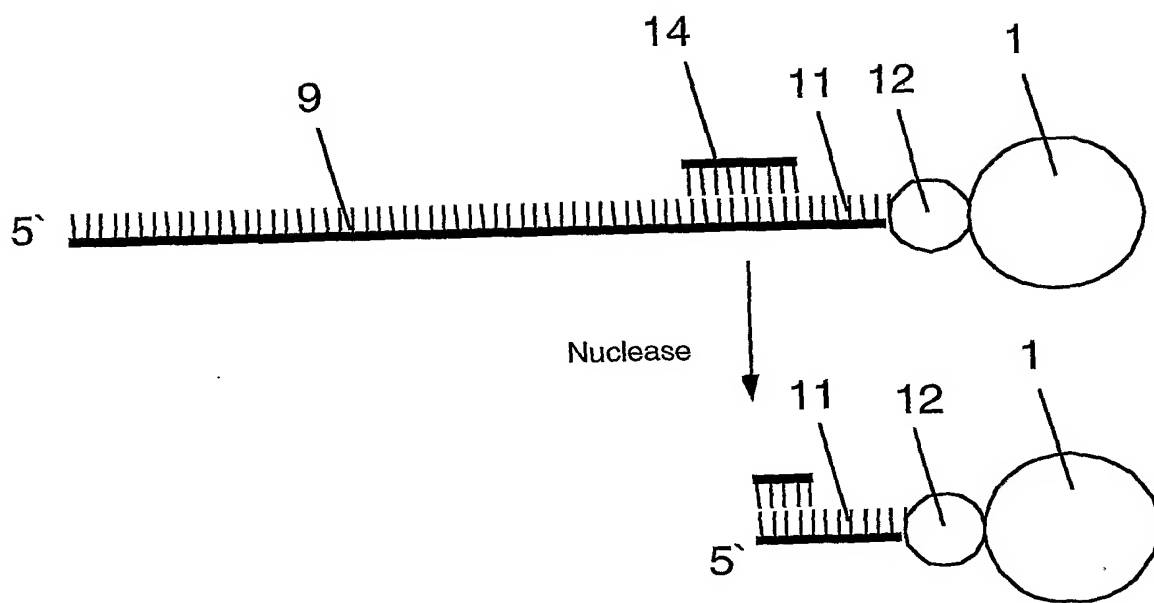


Fig. 5

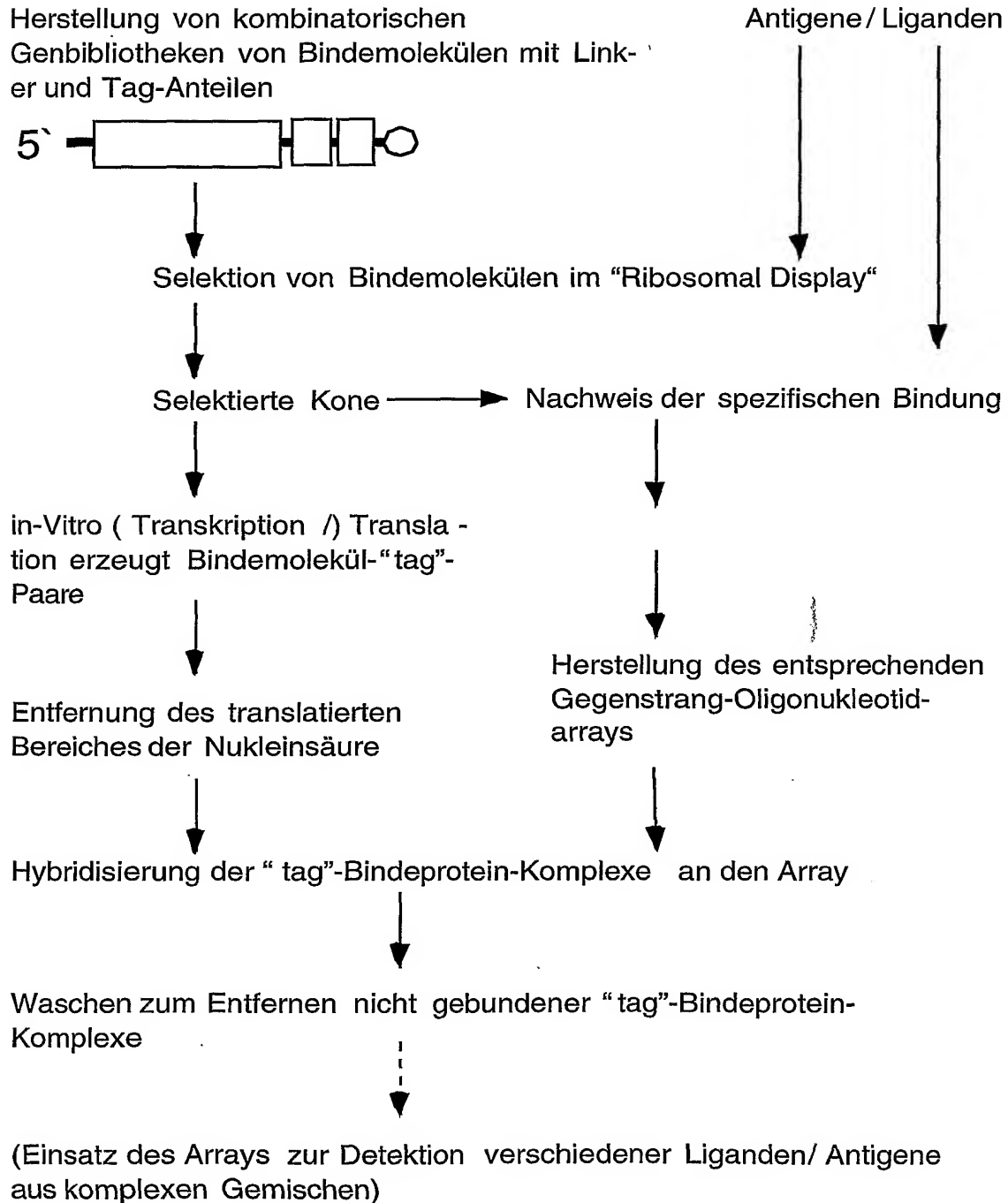


Fig. 6